

Foto: Lidiane Viana Ximenes

COMUNICADO
TÉCNICO

202

Sobral, CE
Dezembro, 2020



Ensaio quantitativo para determinação de saponinas

Alex Miranda de Araújo
Hévila Oliveira Salles

Ensaio quantitativo para determinação de saponinas¹

¹ Alex Miranda de Araújo, engenheiro-químico, mestre em Saneamento Ambiental, analista da Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral, CE.

Hévila Oliveira Salles, médica-veterinária, doutora em Bioquímica Vegetal, pesquisadora da Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral, CE.

Introdução

As saponinas são metabólitos secundários e estão relacionadas ao mecanismo de defesa de plantas. Sua estrutura possui uma porção lipofílica (triterpeno ou esteroide) e uma hidrofílica (açúcar). As saponinas triterpênicas são encontradas principalmente nas dicotiledôneas, enquanto as saponinas esteroidais ocorrem nas monocotiledôneas, como as gramíneas (Low, 2015).

A importância das saponinas esteroidais está no fato de elas serem hepatotóxicas e nefrotóxicas, e por desencadearem reações de fotossensibilização em animais após consumo de gramíneas, como as do gênero *Urochloa* (Syn. *Brachiaria*), principalmente em ovinos jovens (Muniandy et al., 2020). Folhas jovens e verdes contêm de cinco a dez vezes a concentração de saponina, indicando que as pastagens de *U. decumbens*, por exemplo, provavelmente sejam mais tóxicas durante a brotação e o crescimento inicial (Low, 2015). Isso ocorre porque os tecidos vegetais seriam mais vulneráveis durante o crescimento inicial e, portanto, a presença de saponina atuaria como um mecanismo

de sobrevivência (Low, 2015). Lozano et al. (2017) observaram também em *Urochloa spp*, que a quantidade de saponina ao longo do ano sofre influência da temperatura, da umidade, do estresse abiótico, da espécie e de seus híbridos.

Várias outras espécies vegetais, como *Panicum spp*, *Nartheccium spp* e *Tribulus spp*, além de *U. decumbens*, têm efeito semelhante de toxicidade devido à presença de saponinas esteroidais associadas à fotossensibilização (Muniandy et al., 2020). Zaki et al. (2017) relataram a existência de saponinas esteroidais em *Panicum turgidum* Forssk. e que essas apresentaram efeito citotóxico *in vitro*.

Diante do exposto, em programas de melhoramento genético que levam à indicação de cultivares, se assegurar dos níveis quantitativos de saponina nas variedades trabalhadas pode reduzir os riscos de problemas futuros no fornecimento aos animais.

Como revisado por Sparg et al. (2004), as saponinas se dissolvem em água, formando uma solução coloidal que gera espuma após agitação. Essa

característica das saponinas fundamenta sua determinação pelo índice de espuma (IE). O IE expressa a quantidade de líquido extrator necessária para produzir um extrato aquoso (decoto) com um grama da droga vegetal que exiba anel de espuma com 1 cm de espessura após agitados, nas condições do experimento, conforme metodologia preconizada pela Farmacopeia Brasileira (2019).

O presente comunicado descreve metodologia para tornar a determinação indireta de saponina por IE em uma determinação quantitativa baseada em curva padrão com saponina pura comercial. A metodologia mantém o princípio da acessibilidade e baixo custo do método de IE, com o incremento da quantificação.

Metodologia

Para desenvolver a metodologia, inicialmente foram preparadas 100 mL de cinco soluções com saponina padrão comercial (Saponin, Sigma Aldrich, 84510) em água deionizada, nas concentrações de 0,08 mg/mL, 0,12 mg/mL, 0,16 mg/mL, 0,20 mg/mL e 0,28 mg/mL. Em seguida, foi avaliada a estabilidade dessas soluções por até 96h acompanhando a absorbância das soluções a 284 nm.

Segundo a Farmacopeia Brasileira (2019), para determinação do índice de espuma (IE), ensaio indireto para determinação da presença de saponina em uma amostra, cada solução de saponina foi alíquotada em dez tubos de ensaio com tampa, de forma a realizar diluições

em série sucessivas de 1 mL, 2 mL, 3 mL, até 10 mL, com volume do líquido de cada tubo sendo ajustado com água até completar o total de 10 mL. Uma vez tampados, os tubos foram agitados com movimentos verticais por 15 segundos, com duas agitações por segundo. Depois, permaneceram em repouso por 15 minutos, quando a altura da espuma foi mensurada com uma régua.

Os valores obtidos em cm de espuma para cada uma das dez diluições e em cada concentração de saponina avaliada foram plotados em gráfico e geradas equações que melhor explicassem a tendência, ou seja, com valor do coeficiente de determinação (R^2) mais próximo de 1. A melhor equação foi utilizada para determinar o IE para cada concentração de saponina avaliada, considerando a diluição necessária para se obter 1 cm de altura de espuma.

Para se obter a relação entre os valores de IE e as concentrações de saponina (mg/mL), os valores de IE obtidos foram plotados em gráfico no eixo das abscissas (x) e o das concentrações originais das soluções de saponina no eixo das ordenadas (y). Com as correlações entre esses parâmetros, obteve-se a equação de regressão linear passando pela origem, ou seja, $y=ax$, o valor de “a” obtido corresponde ao fator de correção do modelo.

Foram pesadas 5 g de material vegetal reduzido a pó de nove amostras de gramíneas: *Urochloa brizantha* cv Paiguás; *U. brizantha* cv Piatã; *Cynodon dactylon* cv Capim Vaqueiro;

Panicum maximum cv Massai; *P. maximum* cv Tamani; *P. maximum* cv Zuri; *P. maximum* cv Tanzânia; *P. maximum* cv Mombaça; e *Pennisetum purpureum* cv Kurumim, respectivamente, identificadas como A, B, C, D, E, F, G, H e I. Em seguida, transferiu-se para erlenmeyer contendo 50 mL de água fervente. Manteve-se sob fervura moderada durante 30 minutos. Resfriou-se, transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume até 100 mL. A altura da espuma foi determinada em cm para cada amostra nas dez diluições preconizadas pelo método descrito na Farmacopeia Brasileira (2019). Posteriormente, os valores obtidos foram plotados em curva de tendência semelhante à realizada para a saponina padrão. Depois de obtidos os IE para cada amostra, esse foi multiplicado pelo fator de correção da curva de saponina padrão, obtendo-se o

quantitativo de saponina (mg) por g de amostra vegetal avaliada. Nas amostras das nove gramíneas também foi determinada a quantidade de matéria seca (MS), submetendo duas amostras de 1 g de cada amostra vegetal à estufa de secagem a 105 °C, por 24h, pesando o cadinho antes e após a dessecação.

Resultados

A tabela 1 apresenta a absorbância das soluções de saponina padrão comercial a 284 nm ao longo do tempo. Esse achado mostra a estabilidade da curva e do ensaio para mensuração da quantidade de saponina.

As equações que melhor representaram a tendência para as diluições de saponina obterem 1 cm de altura de espuma foram as equações exponenciais (Figura 1).

Tabela 1. Absorbância (284 nm) de soluções de saponina padrão comercial ao longo do tempo.

Solução saponina	Absorbância a 284 nm						
	20 min	1h	2h	24h	48h	72h	96h
0,08 mg/mL	0,100	0,103	0,094	0,100	0,100	0,106	0,106
0,12 mg/mL	0,145	0,153	0,145	0,152	0,151	0,156	0,156
0,16 mg/mL	0,196	0,203	0,196	0,202	0,201	0,208	0,208
0,20 mg/mL	0,250	0,256	0,252	0,257	0,257	0,264	0,264
0,28 mg/mL	0,351	0,359	0,350	0,356	0,356	0,365	0,365
Acidez titulável (mg de ácido láctico.g ⁻¹)	0,37 ± 0,00 C	-	0,80 ± 0,01 B	1,00 ± 0,02 A			

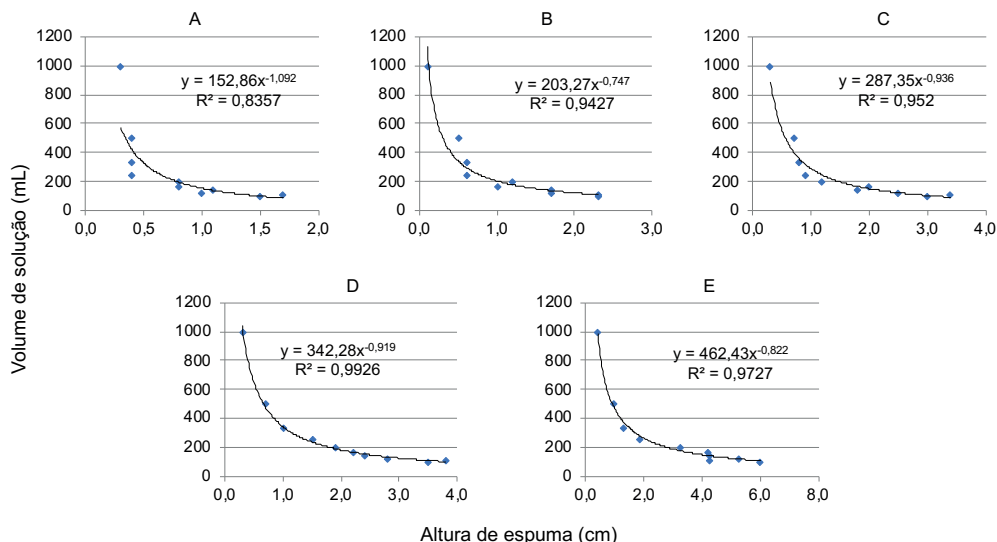


Figura 1. Correlação entre a altura de espuma (cm) e o volume de solução (mL) utilizada em cada diluição das concentrações de saponina padrão trabalhadas: A: 0,08 mg/mL; B: 0,12 mg/mL; C: 0,16 mg/mL; D: 0,20 mg/mL; E: 0,28 mg/mL.

Considerando, então, que x é igual a 1 (cm), aplicando-se nas equações da figura 1, obtém-se o valor da diluição necessária para gerar uma espuma com 1 cm de altura, também conhecido como IE. Fazendo a correlação desses IEs com suas respectivas concentrações de saponina nas soluções avaliadas, obtém-se uma reta que ao passar pela origem gera uma equação em que $y=ax$, sendo “ y ” a concentração de saponina em mg/mL e “ x ” a diluição capaz de gerar 1 cm de espuma nas várias diluições utilizadas. Sendo “ a ” o fator de correção da reta, na saponina comercial, a concentração capaz de gerar uma altura de espuma de 1 cm é exatamente igual a “ a ”, pois sendo “ $x=1$ ”, “ y ” será igual a 0,0006 mg/mL (Figura 2).

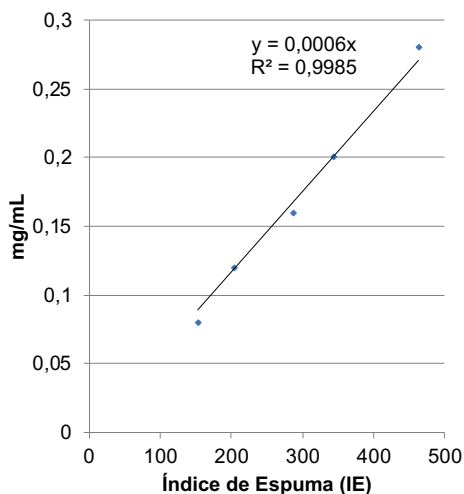


Figura 2. Correlação entre o índice de espuma (IE) e as concentrações de saponina padrão (mg/mL) avaliadas. Fator de correção da reta igual a 0,0006.

Assim como realizado para a sapo-nina padrão, a altura de espuma (cm) foi correlacionada com o volume (mL) de solução utilizada em cada diluição das nove amostras vegetais avaliadas (Figura 3). A equação que melhor explicou essa correlação foi também a equação exponencial.

Considerando, então, que x é igual a 1 (cm), aplicando-se esse valor nas equações da figura 3, obtém-se o valor da diluição necessária para gerar uma espuma com 1 cm de altura para cada amostra vegetal, também conhecido como IE.

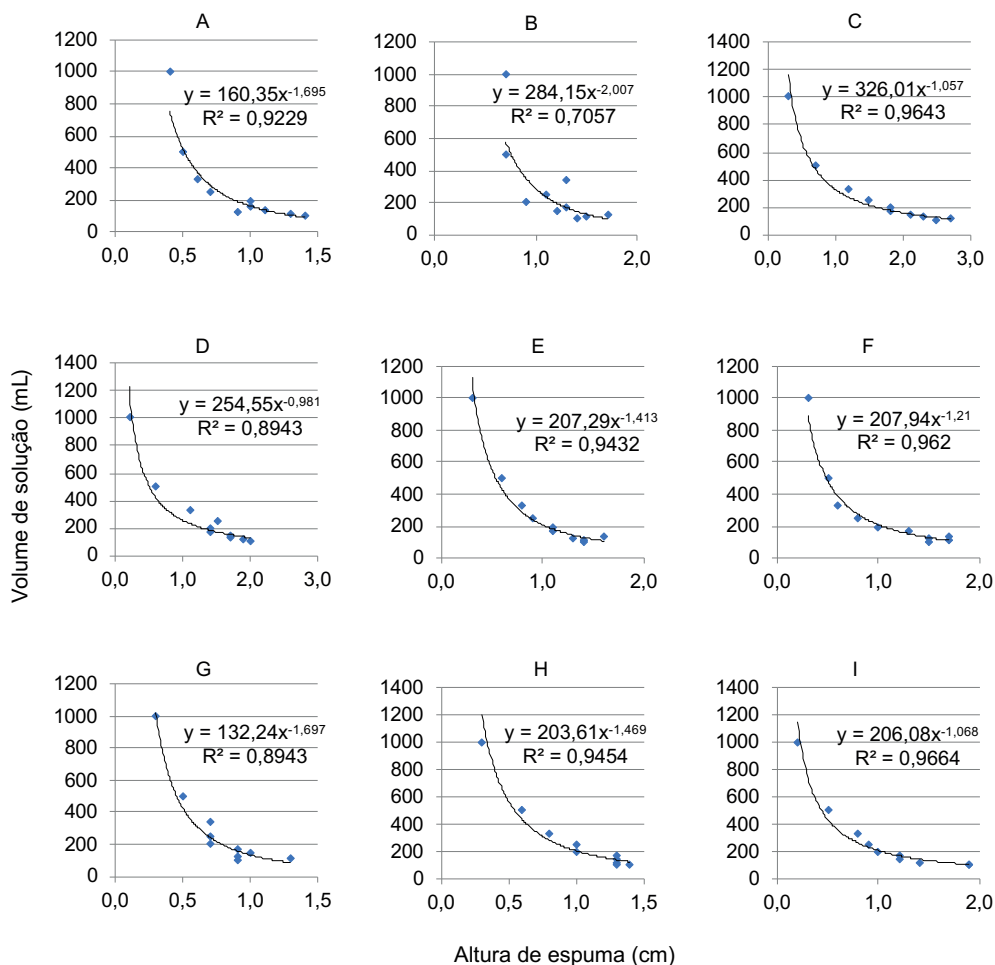


Figura 3. Correlação entre a altura de espuma (cm) e o volume de solução (mL) utilizada em cada diluição das nove amostras vegetais avaliadas.

Recomendações para expressar a quantidade de saponina em amostras vegetais

Os resultados podem ser expressos em IE. Lembrar que foram utilizadas 5 g de material vegetal e não 1 g como preconizado pela Farmacopeia Brasileira (2019). Essa quantidade de 5 g foi utilizada para que as leituras de diluição necessárias para gerarem 1 cm de espuma ficassem dentro da equação da reta obtida com a saponina padrão. Dessa forma, no caso do experimento apresentado aqui, para expressar o valor em IE é preciso primeiro dividir por 5 o valor de IE apresentado na tabela 2.

Multiplicando-se esse IE para 5 g pelo fator de correção (0,0006) obtido na figura 2, têm-se as concentrações de saponina (mg/mL) de cada amostra necessária para gerar 1 cm de altura de espuma (Tabela 2).

Para transformar o resultado em mg/g de folha, como foram utilizados 5 g de amostra para cada 100 mL de solução de extração, primeiramente multiplica-se o valor de mg/mL por 100, assim terá o valor total de saponina na amostra, depois se divide esse valor total por 5 e obtém-se mg/g de folha (Tabela 2).

Para transformar esse valor em g de saponina/g de folha, divide-se por 1000 (Tabela 2).

Agora, caso queira representar esse valor em % de saponina por grama de folha (%/g de folha), é só multiplicar g de saponina/g de folha por 100 (Tabela 2).

Outra maneira de expressar o resultado é com base na matéria seca (MS), assim basta multiplicar o valor de saponina em mg/g de folha pela MS e obter mg/g de MS, se quiser expressar em % de MS, multiplica saponina em mg/g de MS por 100 e divide por 1000 (Tabela 2).

Tabela 2. Diversas formas de expressar os resultados da concentração de saponina: IE, mg/mL, mg/g de folha, g/g de folha, %/g de folha ou mg/g de MS.

Amostras	IE p/ 5g ^a	(IE*0,0006) mg/mL	[(mg/mL*100 mL)/5g] mg/g folha	(mg/g/1000) g/g folha	(g/g*100) %/g folha	MS ^b	mg/gMS	% MS
A	160,35	0,096	1,924	0,0019	0,19	93,32	1,796	0,1796
B	284,15	0,170	3,410	0,0034	0,34	92,5	3,154	0,3154
C	326,01	0,196	3,912	0,0039	0,39	92,24	3,609	0,3609

Continua...

Tabela 2. Continuação.

Amostras	IE p/ 5g ^a	(IE*0,0006) mg/mL	[(mg/mL*100 mL)/5g] mg/g folha	(mg/g/1000) g/g folha	(g/g*100) %/g folha	MS ^b	mg/gMS	% MS
D	254,55	0,153	3,055	0,0031	0,31	93,66	2,861	0,2861
E	207,29	0,124	2,487	0,0025	0,25	93,83	2,334	0,2334
F	207,94	0,125	2,495	0,0025	0,25	94,28	2,353	0,2353
G	132,24	0,079	1,587	0,0016	0,16	94,14	1,494	0,1494
H	203,61	0,122	2,443	0,0024	0,24	94,68	2,313	0,2313
I	206,08	0,124	2,473	0,0025	0,25	91,29	2,258	0,2258

^a O índice de espuma(IE) aqui apresentado está expresso para 5 g de material vegetal, pois o uso de 1 g deixaria as leituras de IE fora da equação da reta obtida para as diluições da saponina padrão. Caso queira expressar o resultado em IE é preciso dividir esses valores de IE aqui apresentados por 5.

^b MS- massa seca.

Valores acima de 1% MS são considerados tóxicos para ovinos (Riet-Correa et al., 2011). As amostras vegetais avaliadas estavam bem abaixo desse valor (Tabela 2).

Os resultados mostram ser eficiente correlacionar o índice de espuma com concentrações conhecidas de saponina padrão para quantificar a concentração de saponina (mg/mL) em amostras vegetais e expressá-la de várias maneiras, de forma a proporcionar comparações com os dados na literatura.

Agradecimentos

À Lidiane Viana Ximenes, técnica da Embrapa Caprinos e Ovinos, pela condução dos experimentos laboratoriais.

Referências

- FARMACOPEIA brasileira. 6. ed. Brasília, DF: Anvisa, 2019. 873 p. v. 1.
- LOW, S. G. Signal grass (*Brachiaria decumbens*) toxicity in grazing ruminants. **Agriculture**, v. 5, n. 4, p. 971-990, 2015. DOI: <https://doi.org/10.3390/agriculture5040971>
- LOZANO, M. C.; MARTINEZ, N. M.; DIAZ, G. J. Content of the saponin protodioscin in *Brachiaria* spp. from the Eastern plains of Colombia. **Toxins**, v. 9, n. 220, p. 1-12, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3390/toxins9070220>
- MUNIANDY, K. V.; CHUNG, E. L. T.; JAAPAR, M. S.; HAMDAN, M. H. M.; SALLEH, A.; JESSE, F.F.A. Filling the gap of *Brachiaria decumbens* (signal grass) research on clinico-pathology and haemato-biochemistry in small ruminants: A review. **Toxicon**, v.174, p. 26-31, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2019.12.158>
- RIET-CORREA, B.; CASTRO, M. B.; LEMOS, R. A. A. de; RIET-CORREA, G.; MUSTAFA, V.; RIET-CORREA, F. *Brachiaria* spp.

poisoning of ruminants in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 3, p. 183-192, mar. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2011000300001>

SPARG, S. G.; LIGHT, M. E.; STADEN, J. van. Biological activities and distribution of plant saponins. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, n. 2/3, p. 219-243, Oct. 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.05.016>

ZAKI, A. A.; ALI, Z.; WANG, Y-H.; EL-AMIER, Y. A.; KHAN, S. I.; KHAN, I. A. Cytotoxic steroidal saponins from *Panicum turgidum* Forssk. **Steroids**, v.125, p. 14-19, Sept. 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.steroids.2017.06.003>

Exemplares desta edição
podem ser adquiridos na:

Embrapa Caprinos e Ovinos
Fazenda Três Lagoas
Estrada Sobral/ Groaíras, Km 4
Caixa Postal: 71
CEP: 62010-970, Sobral, CE
Fone: (88) 3112-7400
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

1ª edição
On-line (2020)



MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



Comitê Local de Publicações
da Embrapa Caprinos e Ovinos

Presidente
Cícero Cartaxo de Lucena
Secretário-Executivo
Alexandre César Silva Marinho

Membros
Alexandre Weick Uchoa Monteiro,
Carlos José Mendes Vasconcelos, Fábio
Mendonça Diniz, Maira Vergne Dias, Manoel
Everardo Pereira Mendes, Marcos André
Cordeiro Lopes, Tânia Maria Chaves Campêlo,
Zenildo Ferreira Holanda Filho

Supervisão editorial
Alexandre César Silva Marinho

Revisão de texto
Carlos José Mendes Vasconcelos

Normalização bibliográfica
Tânia Maria Chaves Campêlo

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Maira Vergne Dias

Foto da capa
Lidiane Viana Ximenes